

การจำแนกเชื้อราต้านเชื้อ *Vibrio* (*Penicillium decumbens*) เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกุ้ง

Identification of Anti-*Vibrio* Fungus (*Penicillium decumbens*) to Inhibit the Growth of *Vibrio parahaemolyticus*, A Bacterial Disease of Shrimp

จันทร์ทิพย์ ทองจันทร์* ศรีณยา รักเสรี และ ชนัดดา เกตุมา

Junthip Tongjun*, Saranya Rakserree and Chanadda Ketma

สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

Fishery Division, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Rajamangala University of Technology Tawan-ok

*E-mail: junthip1111@gmail.com โทรศัพท์ 097-1819263

บทคัดย่อ

ราสายพันธุ์ A5-1 ที่คัดแยกจากนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี สามารถยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) แบคทีเรียสาเหตุโรคกุ้งได้ด้วยเทคนิค dual culture จากการจำแนกทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับอนุพันธุศาสตร์ของลำดับเบสที่ตำแหน่ง SSU rRNA และ 18S rRNA พบว่าสายพันธุ์ A5-1 จำแนกได้เป็น *Penicillium decumbens* ราสามารถผลิตเอนไซม์เจลาติเนส ไลเปส เซลลูเลส โปรติเอส และเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือระดับต่าง ๆ (0-60 psu) จัดเป็นราทนเค็ม ใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลรวม 36 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง Vibrio พบว่า ทุกชุดการทดลองให้ค่าโซนใสต่อการยับยั้ง Vp ดังนั้น pH ความเข้มข้นแอมโมเนียมและความเค็มที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการสร้างสารของรา โดยชุดทดลอง T36 (1.0:9:30) ให้ค่าของโซนใสยับยั้ง Vp มากที่สุดเท่ากับ 2.56 ± 0.06 ซม. การเจริญร่วมกันในอาหารเหลวพบว่าความเค็ม 10 และ 20 psu ความเข้มข้นของสปอร์ราที่ 7.08×10^5 สปอร์/มล. และ 1.36×10^6 สปอร์/มล. สามารถลดจำนวน Vp จากเซลล์เริ่มต้นที่ 10^5 CFU/mL ให้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 CFU/mL ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และที่ความเค็ม 30 psu ความเข้มข้นของสปอร์ราที่ 2.47×10^6 สปอร์/มล. และ 2.94×10^6 สปอร์/มล. สามารถลดจำนวน Vp จากเซลล์เริ่มต้นที่ 10^7 CFU/mL ให้น้อยกว่า 100 CFU/mL ได้ที่ชั่วโมงที่ 96 ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้ *P. decumbens* A5-1 ในการควบคุมจำนวนของ Vp ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

คำสำคัญ : เพนิซิลเลียม ดีคัมเบน วิบริโอ พาราเฮโมไลติคัส โรคกุ้ง

Abstract

Fungal strain A5-1 was isolated from solar saltern land in Chanthaburi province that could inhibit *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), a bacterial disease of shrimp by the dual culture technique. Morphology and molecular genetics identification using SSU rRNA and 18S rRNA gene sequences confirmed that the strain A5-1 is *Penicillium decumbens* that produced gelatinase, lipase, cellulase and protease, and showed an ability to grow in the presence of the different NaCl concentrations (0-60 psu) that classified as halotolerant fungi. 36 trial experimental sets in factorial design were used to determine the factors of anti-*Vibrio* substances production. All experimental sets showed the diameter of clear zone to inhibit Vp; therefore, the increasing of pH, ammonium concentrations and salinity had an effect on fungal substances production. The inhibition of maximum diameter of 2.56 ± 0.06 cm showed in treatment T36 (1.0:9:30). The co-culture in broth presence the salinity of 10 and 20 psu, at 7.08×10^5 and 1.36×10^6 spores/mL of the fungal spore concentration could reduce number of Vp from 10^5 CFU/mL to less than or equal to 100 CFU/mL at 24 hours of incubation time,

and at 2.47×10^6 and 2.94×10^6 spores/mL of fungal spore concentration could reduce number of *Vp* from 10^7 CFU/mL to less than 100 CFU/mL at 96 hours of incubation time in 30 psu of salinity in broth. Therefore, *P. decumbens* A5-1 could be applied to control number of *Vp* in shrimp culture.

Keywords : *Penicillium decumbens*, *Vibrio parahaemolyticus*, Disease of Shrimp

1. บทนำ

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี 2552-2553 มีผลผลิตกุ้งเลี้ยงสูงสุดประมาณ 600,000 ตัน แต่ด้วยปัญหาปริมาณกุ้งล้นตลาดสวนทางกับต้นทุนที่ปรับตัวสูงขึ้น สภาพอากาศแปรปรวน และปัญหาโรคกุ้งส่งผลให้ราคากุ้งตกต่ำไปทั่วโลก ในปี 2554 ไทยพบการระบาดของโรคกุ้งตายด่วน (Early Mortality Syndrome : EMS) เป็นครั้งแรก ในภาคตะวันออกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากลุ่มอาการตับและตับอ่อนตายเฉียบพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome : AHPNS) โรค EMS พบในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) กุ้งมีอาการว่ายน้ำเฉื่อย เชื่องซึม เปลือกนูน ลำตัวมีสีซีด เซลล์ตับและตับอ่อนฝ่อ กุ้งทยอยตายภายใน 7-35 วัน มีการตายสูงถึง 100% ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมีสาเหตุจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) (Chucherd, 2013) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนโค้ง ชอบเค็ม (halophile) ต้องการเกลือในการเจริญและเจริญได้ดีที่ความเค็ม 10-30 psu อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ 35-37 °C และ pH 6-9 พบทั่วไปในน้ำทะเลและอาหารทะเล (Yeung & Boor, 2004) กุ้งจะเกิดการติดเชื้อเฉพาะที่ในกระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน โดยได้รับเชื้อจากอาหารสด น้ำ ชี้กุ้ง และจากกุ้งพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก (hatchery) สามารถพบเชื้อในโรงอนุบาลกุ้ง (nursery) ในกุ้งระยะ postlarvae (PL) และ *Vp* มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนมากในกุ้งทะเลตัวเต็มวัยในช่วงท้ายของการเลี้ยง ทั้งในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน (Yingkajorn *et al.*, 2014) ปัจจุบันยังพบการระบาดของโรค EMS ทั้งภาคใต้และภาคตะวันออกการจัดการทางเคมีและทางกายภาพยกยั้ง *Vp* การจัดการทางชีวภาพโดยใช้ราที่สามารถเจริญและทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่วิกฤต เช่น นาเกลือ (solar salterns) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่สูงถึง 30% (Plemenita *et al.*, 2008) ความเข้มข้นของสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ดึงมาใช้ได้ ค่า pH รั้งสีจากแสงอาทิตย์ อุณหภูมิ และไอออนต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสม (Griffith, 1994) ในสภาวะวิกฤตเพื่อการอยู่รอดจะสร้างเอนไซม์หลายชนิดใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเพื่อเป็นอาหาร (Fuentes & Quiñones, 2016) สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง เช่น มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเซลล์มะเร็ง (Phongpaichit *et al.*, 2007) ช่วยให้ร่าดำรงชีวิตในสภาวะวิกฤตได้ การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิที่ร่าสร้างขึ้นเพื่อยับยั้ง *Vp* ที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการเตรียมน้ำเริ่มต้น หรือน้ำหลังเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรค

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นนาร่าที่คัดแยกจากนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี สายพันธุ์ A5-1 ที่ผ่านการคัดกรองคุณสมบัติการชอบเค็มของร่า การสร้างเอนไซม์และผ่านการทดสอบคุณสมบัติเป็นราปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกุ้งสายพันธุ์ *Vp* มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของร่า ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียม pH และความเค็ม ศึกษาความเข้มข้นของร่าและเวลาในการยับยั้งจำนวน *Vp* เมื่อเจริญร่วมกันในอาหารเหลวที่ความเค็มระดับต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ร่าปรับปรุงคุณภาพน้ำที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล จัดเป็นการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ที่มีความเป็นมิตรต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง ลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ก่อปัญหาสารเคมีตกค้างทั้งในสัตว์น้ำและสภาพแวดล้อม ลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียช่วยลดความเสี่ยงจากโรคกุ้งตายด่วนของเกษตรกรและผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องตลอดห่วงโซ่การผลิต

2. วิธีการทดลอง

2.1 การคัดแยกรา

ราถูกคัดแยกจากดินในนาเกลือ อำเภอนาทม จังหวัดจันทบุรี เก็บดินจำนวน 3 บ่อ แต่ละบ่อเก็บดิน 3 ข้ำ ใช้ท่อพีวีซีเก็บดินจากหน้าดินลึกลงไปดิน 15 ซม. การคัดแยกราดินแต่ละข้ำ 10 กรัม มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มล. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน 30 นาที เจือจางให้มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-3} (Gunasekaran, 1995) แล้วเกลี่ยเชื้อปริมาตร 0.1 มล. ในจานอาหาร potato dextrose agar (PDA: Difco, USA) ผสมน้ำทะเลความเข้มข้น 30 psu (PDA_{sw30}) ปรับ pH 5.6 แต่ละความเจือจางทำ 3 ข้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 7-21 วัน คัดแยกราในจานอาหารด้วยวิธี hyphal tips isolation จนได้ราบริสุทธิ์เก็บรักษาในอาหาร PDA_{sw30}

2.2 การจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยา และอนุพันธุศาสตร์

ศึกษาลักษณะโคโลนีราบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA: Difco, USA) ผสมน้ำทะเลที่ความเค็ม 30 psu (SDA_{sw30}) ศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้วิธีการเพาะเชื้อบนสไลด์ (slide culture) และถ่ายภาพจำแนกชนิดของราเทียบกับคู่มือ Illustrated genera of imperfect fungi 4th edition (Barnett and Hunter, 2006) นำราไปสกัดดีเอ็นเอใช้เป็นแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ SSU rRNA (small subunit rRNA) และ 18S rRNA ของยีนด้วยไพรเมอร์ NS1 5' (GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) 3' และไพรเมอร์ NS24 5' (TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA) 3' ณ บริษัทแมคโครเจน ประเทศเกาหลี (Macrogen, Seoul, Republic of Korea) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม MEGA 11 เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank (National Center for Biotechnology Information) (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการโดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-Joining Tree (Ong et al., 2023)

2.3 ทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็มของราและการผลิตเอนไซม์

ทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็มของราในอาหาร PDA ผสมน้ำทะเลที่ความเค็ม 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 psu ใช้ cork-borer (Ø = 6 มม.) เจาะวงบริเวณปลายเส้นใยราไปวางบริเวณกลางอาหารบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราใช้แปลผลคุณสมบัติการชอบเค็มของรา (Kushner, 1993) คัดเลือกราที่เจริญได้ดีที่ความเค็ม 0-30 psu มาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เจลาติเนส โปรติเอส โลเปส และเซลลูโลสบนอาหาร starch agar, gelatin agar, skim milk agar, tween-80 agar และ cellulose agar ที่ผสมน้ำทะเลความเข้มข้น 10 psu ทำการทดลอง 3 ข้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28°C 7-10 วัน ตรวจสอบผลการสร้างเอนไซม์

2.4 การคัดกรองราที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี คัดแยกจากกุ้งตายที่แสดงอาการของโรค EMS กุ้งมีลักษณะเปลือกนึ่ม สีลำตัวซีด ตับอ่อนฝ่อ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Vpa Vpb และ Vpc ทั้ง 3 สายพันธุ์ดื้อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) เตตราไซคลิน (tetracycline) และซิโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) การคัดกรองใช้วิธี dual culture ดัดแปลงจาก Dinesh et al. (2015) ใช้ cork-borer (Ø = 6 มม.) เจาะวงบริเวณปลายเส้นใยราที่เจริญในอาหาร PDA_{sw10} นาน 7 วัน นำไปวางบริเวณกลางอาหาร Mueller Hinton agar (MHA: Himedia, India) ที่ผสมน้ำทะเลที่ความเค็ม 10 psu (MHA_{sw10}) ให้ราเจริญเติบโตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปปลูก Vp ลงในอาหารเดียวกัน (Vp แต่ละสายพันธุ์ทำแยกจานอาหาร) ชูดควมคุมเพาะเลี้ยงเฉพาะราบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการทดลองเป็นเวลา 7-10 วัน

2.5 ศึกษาผลของ pH แอมโมเนียม และความเค็มต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของรายับยั้ง Vpa

ออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) ดังนี้ เตรียมอาหาร potato dextrose broth (PDB: Difco, USA) 100 มล. ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียม 3 ระดับ (0, 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร) ค่าความเป็น

กรด-ต่าง 4 ระดับ (6, 7, 8 และ 9) และค่าความเค็ม 3 ระดับ (0, 15 และ 30 psu) ใช้สัญลักษณ์ $\text{NH}_4^+:\text{pH}:\text{psu}$ ชุดทดลองรวม 36 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ เตรียมรา A5-1 ลงในอาหาร 4 ชั้น (7.08×10^5 สปอร์/มล.) ด้วย cork-borer ($\varnothing = 6$ มม.) เลี้ยงราที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบการยับยั้ง *Vpa* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเลี้ยง *Vpa* ในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB: Himedia, India) ผสม 1% NaCl ข้ามคืนแยกเซลล์ล้างทำความสะอาดและเตรียมให้มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^6 CFU/mL นำมาเกลี่ยบนอาหาร MHA ที่ผสม 1% NaCl เจาะหลุมด้วย cork borer ($\varnothing = 6$ มม.) ปิบน้ำเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (Inhibition zone)

2.6 ศึกษาความเข้มข้นของราและเวลาต่อการยับยั้ง *Vpa* ที่ความเค็มระดับต่าง ๆ

เตรียมรา A5-1 จำนวน 4 ชั้น (7.08×10^5 สปอร์/มล.) 5 ชั้น (1.36×10^6 สปอร์/มล.) 6 ชั้น (2.18×10^6 สปอร์/มล.) 7 ชั้น (2.47×10^6 สปอร์/มล.) และ 8 ชั้น (2.94×10^6 สปอร์/มล.) ด้วย cork-borer ($\varnothing = 6$ มม.) ลงในอาหาร MHB 100 มล. ผสมน้ำทะเลที่ความเค็ม 10, 20 และ 30 psu (MHB_{sw10}, MHB_{sw20} และ MHB_{sw30}) ปรับ pH 7.3 เลี้ยงราที่อุณหภูมิห้องมีอัตราเขย่า 120 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง และเติม *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL) ความเข้มข้น 2% ลงในชุดทดลองที่ 1-3 บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อหาจำนวน *Vpa* ในอาหาร Nutrient agar ผสม 1% NaCl ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ *Vpa* ชุดควบคุมเลี้ยงเฉพาะ *Vpa* ลงในอาหาร MHB_{sw10}, MHB_{sw20} และ MHB_{sw30} ในชุดการทดลองที่ 4 ใช้ *Vpa* (1.5×10^8 CFU/mL) ความเข้มข้น 2% ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 ชุดการทดลอง (3 ซ้ำ) ทำการทดลองที่ละชุดตามลำดับ ดังนี้

- ชุดทดลองที่ 1** TC1 : MHB_{sw10} + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL) (ชุดควบคุม)
 T11 : MHB_{sw10} + A5-1 จำนวน 4 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
 T12 : MHB_{sw10} + A5-1 จำนวน 5 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
- ชุดทดลองที่ 2** TC2 : MHB_{sw20} + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL) (ชุดควบคุม)
 T21 : MHB_{sw20} + A5-1 จำนวน 4 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
 T22 : MHB_{sw20} + A5-1 จำนวน 5 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
- ชุดทดลองที่ 3** TC3 : MHB_{sw30} + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL) (ชุดควบคุม)
 T31 : MHB_{sw30} + A5-1 จำนวน 4 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
 T32 : MHB_{sw30} + A5-1 จำนวน 5 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^6 CFU/mL)
- ชุดทดลองที่ 4** TC4 : MHB_{sw30} + *Vpa* (1.5×10^8 CFU/mL) (ชุดควบคุม)
 T41 : MHB_{sw30} + A5-1 จำนวน 6 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^8 CFU/mL)
 T42 : MHB_{sw30} + A5-1 จำนวน 7 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^8 CFU/mL)
 T43 : MHB_{sw30} + A5-1 จำนวน 8 ชั้น + *Vpa* (1.5×10^8 CFU/mL)

2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One-Way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองด้วยวิธี Post Hoc (Least-Significant Different : LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

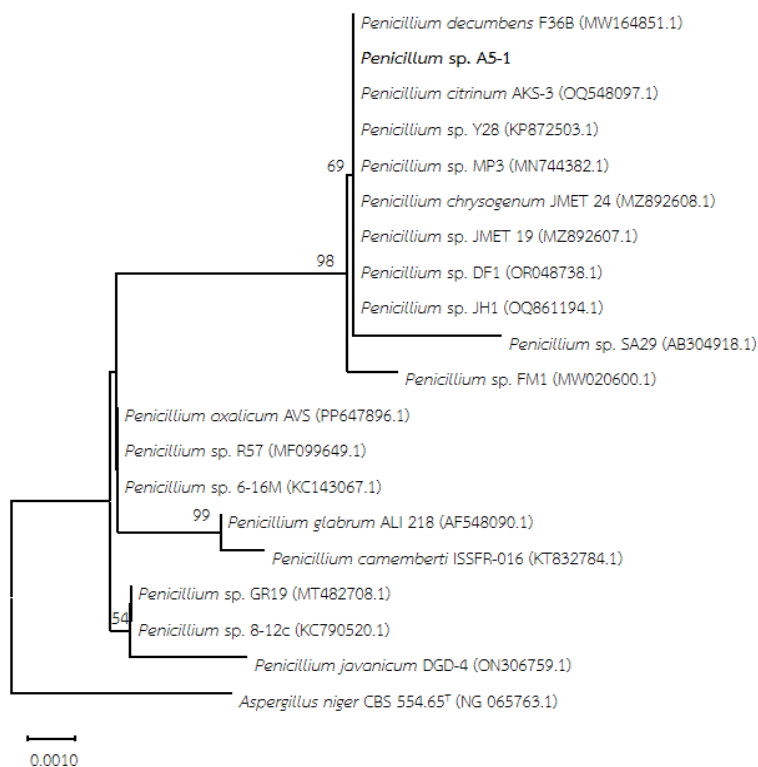
รากูกัดแยกจากดินในนาเกลือ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกรกฎาคม 2561 แสดงในภาพที่ 1 (ก) รวมทั้งสิ้น 90 สายพันธุ์ พบราสายพันธุ์ A5-1 ในตัวอย่างดินในเดือนเมษายนและเดือนกรกฎาคม ค่าความเค็มของน้ำ 150-360 psu และค่าความเค็มของดิน 180-340 psu ค่า pH ของน้ำเกลือ 7.3-7.6 มี

ลักษณะเป็นต่างอ่อน ศึกษาสัณฐานวิทยาของราบนอาหาร SDA_{sw30} พบว่าเส้นใยหาอาหารของรา มีสีขาวมีผนังกัน เส้นใยสีบัพันธ์มีก้านชูสปอร์ขึ้นเหนืออาหารเล็กน้อยสร้างเส้นใยและสปอร์สีเขียว สปอร์มีรูปร่างกลมรี รูปร่างโคโลนีและเส้นใยของราแสดงในภาพที่ 1 (ข) จำแนกชนิดของราเทียบกับคู่มือพบว่าราสายพันธุ์ A5-1 จัดอยู่ในดิวิชัน Ascomycota คลาส Eurotiomycetes ออเดอร์ Eurotiales แฟมิลี Aspergillaceae จีนัส *Penicillium* สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิดโคนิเดีย (conidia) บนก้านชูที่มีลักษณะเป็นพวงหรือช่อ (phialide) ที่อยู่ปลายสุดของก้านชูสปอร์ (conidiophore) (Barnett and Hunter, 2006) แสดงผลในภาพที่ 1 (ค)

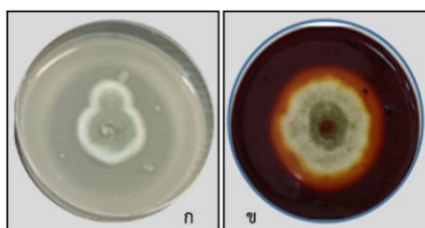


ภาพที่ 1 นาเกลือ จังหวัดจันทบุรี (ก) รูปร่างโคโลนีด้านหน้าและด้านหลังของ *P. decumbens* A5-1 ในอาหาร SDA_{sw30} (ข) สปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิดโคนิเดียของ *P. decumbens* A5-1 (ค)

การจำแนกทางอนุพันธุศาสตร์ใช้วิธีเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,684 เบสของยีนที่ตำแหน่ง SSU rRNA และ 18S rRNA นิวคลีโอไทด์ 1,650 เบสถูกนำไปเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank และแสดงความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการในภาพที่ 2 พบว่าลำดับเบสของราสายพันธุ์ A5-1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ *Penicillium decumbens* (*P. decumbens*) (GenBank no. MW164851.1) และ *Penicillium citrinum* (*P. citrinum*) (GenBank no. OQ548097.1) มากที่สุด เมื่อใช้เกณฑ์ทางสัณฐานวิทยาได้แก่รูปร่างโคโลนี รูปร่างสปอร์ สีเส้นใย และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °C จึงอาจจัดจำแนกราสายพันธุ์ A5-1 เป็น *P. decumbens* เนื่องจาก *P. citrinum* เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมินี้ (Guevara-Suarez et al., 2016) *P. decumbens* พบได้ทั่วไปในดิน กิ่งเขตร้อน เขตร้อน และดินชายฝั่งทะเล ซึ่งจีนัส *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* และ *Cladosporium* ถูกยืนยันว่ามีความถี่และความหลากหลายมากที่สุดที่จะพบในแหล่งน้ำทั่วโลกที่มีเกลือสูงทั้งทะเลสาบน้ำลึกที่มีสารอาหารต่ำ รวมถึงทะเลสาบน้ำนิ่งชุ่มมีสารอาหารมาก พบในดิน อากาศ และเศษใบไม้ การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ ภูมิศาสตร์ ชนิดสารอาหารเป็นสาเหตุให้เกิดการแพร่กระจายของราและทำให้เราต้องเพิ่มจำนวนและรอดชีวิต พบมากถึง 3,000 สปีชีส์ในแหล่งน้ำ (Abdel-Aziz, 2008) สายพันธุ์ที่พบมากได้แก่ *Penicillium chrysogenum* และ *Aspergillus niger* (Butinar et al., 2011) *P. decumbens* เป็นราเส้นใยประจำถิ่นมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ของระบบนิเวศชายฝั่ง สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนได้มากถึง 18 ชนิด ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ส่วนหนึ่งขึ้นกับชนิดเอนไซม์ที่สร้างขึ้น จากการศึกษาพบว่า *P. decumbens* A5-1 ผลิตเอนไซม์เอลลาทินเนสได้ดีที่สุด ผลิตเซลลูเลส (ภาพที่ 3) ไลเปส และโปรติเอสแต่ไม่ผลิตอะไมเลส ซึ่งแตกต่างจากรานาเกลือที่คัดแยกได้ ราวส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้น *P. decumbens* A5-1 จึงมีคุณสมบัติย่อยสลายของเสียและสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ ซึ่งเป็นบทบาทหลักของราในตะกอนดินก้นบ่อเพาะเลี้ยงช่วยทำให้น้ำสะอาด (Zhou et al., 2009)



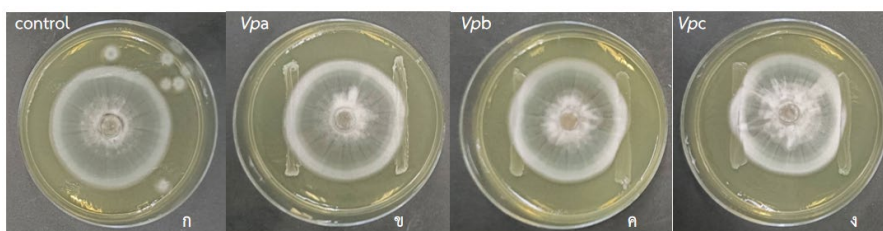
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ *Penicillium* sp. A5-1 ใช้โปรแกรม MEGA 11 สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining Tree



ภาพที่ 3 *P. decumbens* A5-1 สร้างเอนไซม์เจลาติเนสบนอาหาร gelatin agar (ก) เอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร cellulose agar (ข)

การเจริญของราในอาหาร PDA ที่มีความเค็มตั้งแต่ 0-60 psu พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีค่า 5.27 ± 0.06 , 5.23 ± 0.06 , 4.1 ± 0.1 , 3.47 ± 0.06 , 1.47 ± 0.06 , 1.0 ± 0.0 และ 0.8 ± 0.0 ซม. ในอาหาร PDA_{dw} (อาหารผสมน้ำกลั่น) PDA_{sw10} PDA_{sw20} PDA_{sw30} PDA_{sw40} PDA_{sw50} และ PDA_{sw60} ตามลำดับ จึงจัดให้ *P. decumbens* A5-1 เป็นราที่ทนเค็ม (halotolerant fungi) (Kushner, 1993) เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร PDA ที่ผสมน้ำกลั่น ในอาหารที่มีเกลือเพิ่มขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีจะลดลง เนื่องจากเกลือไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญของรา อาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง น้ำในอาหารจะสร้างพันธะกับเกลือจึงเหลือน้ำที่ราจะนำมาใช้ได้น้อยลง ราจึงมีการเจริญลดลงและต้องปรับตัวให้รอดชีวิต โดยการสร้างสปอร์ (Mandeel, 2006) มีรายงานว่าราทนเค็มสามารถปรับตัวให้รอดชีวิตในช่วงความเค็มหนึ่งที่อาจสูงถึง 30% NaCl (Plemenita et al., 2008) จึงจัด *P. decumbens* A5-1 เป็นรากลุ่มทนเค็มสอดคล้องกับหน้าที่ของการพบรานี้ทั้งในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน น้ำมีค่าความเค็ม 150-360 psu และดินมีค่าความเค็ม 180-340 psu เป็นความเค็มที่สูงที่สุดทั้งน้ำและดิน จากการเป็นราทนเค็มสามารถประยุกต์ใช้ราน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็มได้

การคัดกรองราที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย Vp จำนวน 3 สายพันธุ์ (*Vpa*, *Vpb* และ *Vpc*) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร MHA^{sw10} พบราเนกลีจำนวน 11 สายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้ง Vp ได้คิดเป็น 12.22% ของราทั้งหมด และ *P. decumbens* A5-1 เป็นสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4) *P. decumbens* A5-1 สร้างโคโลนีคลุมโคโลนีของแบคทีเรีย Vp ทั้ง 3 สายพันธุ์ตามแนวรัศมีวงกลม โดยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดควบคุมมีขนาดเล็กเคียงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราที่ยับยั้ง *Vpa*, *Vpb* และ *Vpc* ซึ่งรูปร่างโคโลนีของราที่แผ่คลุม *Vpa* มีรูปร่างกลมสมบูรณ์ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Vpb* และ *Vpc* แสดงถึงความสามารถของราที่ยับยั้ง *Vpa* ได้ดีที่สุดจึงใช้ *Vpa* เป็นตัวแทนในการศึกษาในการทดลองถัดไป นอกจากการยับยั้ง Vp แล้ว Mani et al., (2016) รายงานว่า *P. decumbens* AJA1 ที่คัดแยกจากเศษใบไม้สามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Kelbsiella* sp., *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* sp. และ *Staphylococcus aureus* ได้



ภาพที่ 4 *P. decumbens* A5-1 ยับยั้งแบคทีเรีย Vp 3 สายพันธุ์ *Vpa* (ข) *Vpb* (ค) และ *Vpc* (ง) ด้วยวิธี dual culture เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ก)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างสารของราโดยทั่วไปได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียม pH และความเค็มโดยจำลองจากสภาพแวดล้อมของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งขาวอยู่ในช่วง 0.03-0.25 มก.ต่อลิตร (Adiwidjaya et al., 2003) ระดับแอมโมเนียมที่กุ้งขาวทนได้ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.8 มก.ต่อลิตร (Suantika et al., 2015) และไม่ควรเกิน 1 มก.ต่อลิตร กุ้งจะเจริญเติบโตได้ในช่วง pH 6-9 และเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 7.5-8.5 ความเค็ม 2-35 psu ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงคือ 15-30 psu (Haliman & Adijaya, 2005) ถ้าเราสามารถเจริญและสร้างสารในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งจะสามารถนำรามาใช้ประโยชน์ได้ ผู้วิจัยจึงออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) โดยเลี้ยงราที่สภาวะต่าง ๆ รวม 36 ชุดการทดลอง ในอาหาร PDB เป็นเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงรามายับยั้ง *Vpa* บนจานอาหารแข็งด้วยเทคนิค agar well diffusion แสดงผลในตารางที่ 1 พบว่าสภาวะที่ pH คงที่ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมและความเค็มที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มส่งเสริมให้ราสร้างสารยับยั้ง *Vpa* ในน้ำเลี้ยงเพิ่มขึ้น และ pH มีผลต่อการสร้างสารพบว่าเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงไปทางต่าง คือ 8 และ 9 ราจะสร้างสารยับยั้ง *Vpa* ได้ไซนไฮขนาดใหญ่มากกว่าที่ pH 6 และ 7 โดยชุดทดลอง T36 (1.0:9:30) ให้ค่าไซนไฮมากที่สุด (2.56 ± 0.06 ซม.) และชุดทดลอง T1 (0:6:0) ให้ค่าไซนไฮน้อยที่สุด (0.83 ± 0.06 ซม.) เส้นผ่านศูนย์กลางของไซนไฮในชุดทดลอง pH 8 แสดงในภาพที่ 5 (ก) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าผลของ pH ในชุดทดลอง T1, T10, T19 และ T28 ที่มีแอมโมเนียม 0 มก.ต่อลิตร และความเค็มเท่ากับ 0 psu ค่าไซนไฮในชุด T19 และ T28 มีความแตกต่างกับ T1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้น pH 8 และ 9 อาจเหมาะสมต่อการสร้างสารเมื่อเปรียบเทียบกับ pH 6 สามารถประยุกต์ใช้ราในการเตรียมน้ำก่อนใช้เพาะเลี้ยงกุ้งและบำบัดน้ำหลังเพาะเลี้ยงกุ้งเพราะราเจริญเติบโตและสร้างสารได้ดีที่ pH 6-9 ขณะที่กุ้งเจริญได้ดีที่ pH 7.5-8.5 (Haliman & Adijaya, 2005)

ตารางที่ 1 ผลของ pH แอมโมเนียม และความเค็มต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของ *P. decumbens* A5-1 ยับยั้ง *Vpa*

ชุดการทดลอง: เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ($\bar{O} \pm SD$) (ชม.)											
NH_4^+ :pH:psu			NH_4^+ :pH:psu			NH_4^+ :pH:psu			NH_4^+ :pH:psu		
T	pH 6	$\bar{O} \pm SD$	T	pH 7	$\bar{O} \pm SD$	T	pH 8	$\bar{O} \pm SD$	T	pH 9	$\bar{O} \pm SD$
1	0:6:0	0.83 ± 0.06^{BAa}	10	0:7:0	0.96 ± 0.06^{BCc}	19	0:8:0	1.20 ± 0.00^{DF}	28	0:9:0	1.20 ± 0.00^{DJe}
2	0:6:15	1.33 ± 0.06^b	11	0:7:15	1.36 ± 0.06^d	20	0:8:15	1.46 ± 0.06	29	0:9:15	1.56 ± 0.06^f
3	0:6:30	1.26 ± 0.06^b	12	0:7:30	1.36 ± 0.06^d	21	0:8:30	1.40 ± 0.00	30	0:9:30	1.60 ± 0.10^f
4	0.5:6:0	1.56 ± 0.06^B	13	0.5:7:0	1.63 ± 0.06^D	22	0.5:8:0	1.76 ± 0.06^G	31	0.5:9:0	1.80 ± 0.10^K
5	0.5:6:15	1.76 ± 0.06	14	0.5:7:15	1.70 ± 0.00	23	0.5:8:15	1.90 ± 0.00	32	0.5:9:15	1.86 ± 0.06
6	0.5:6:30	1.76 ± 0.06	15	0.5:7:30	1.96 ± 0.12	24	0.5:8:30	2.00 ± 0.00	33	0.5:9:30	2.10 ± 0.10
7	1.0:6:0	1.96 ± 0.06^B	16	1.0:7:0	2.06 ± 0.06^E	25	1.0:8:0	2.23 ± 0.06^H	34	1.0:9:0	2.53 ± 0.06^L
8	1.0:6:15	1.93 ± 0.06	17	1.0:7:15	2.00 ± 0.00	26	1.0:8:15	2.23 ± 0.06	35	1.0:9:15	2.53 ± 0.06
9	1.0:6:30	1.86 ± 0.06	18	1.0:7:30	2.16 ± 0.06	27	1.0:8:30	2.26 ± 0.06	36	1.0:9:30	2.56 ± 0.06

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ Ω และ β ที่ไม่เหมือนกันในแนวนอน หมายถึง $\bar{O}$ ของโซนใสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

: ตัวอักษร A B C D E F G H J K และ L ที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง $\bar{O}$ ของโซนใสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

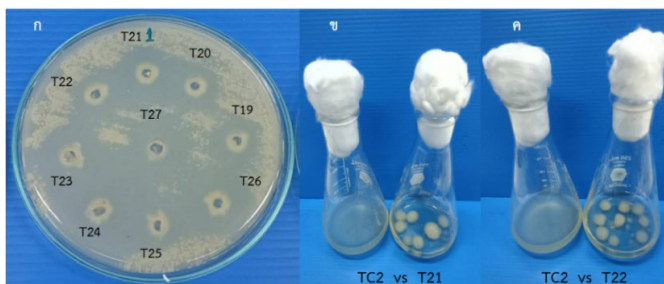
: ตัวอักษร a b c d e และ f ที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง $\bar{O}$ ของโซนใสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลของแอมโมเนียมพิจารณาจากชุดของ pH 6 (T1, T4 และ T7) pH 7 (T10, T13 และ T16) pH 8 (T19, T22 และ T25) และ pH 9 (T28, T31 และ T34) ทุกชุดจะอยู่ในสภาวะที่ pH คงที่ ความเค็มเท่ากับ 0 psu และความเข้มข้นของแอมโมเนียมเท่ากับ 0, 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าค่าโซนใสในแต่ละชุดการทดลองของแต่ละ pH มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ยกเว้น T4 ค่าโซนใสไม่แตกต่างจาก T7 ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นของแต่ละชุดทดลองโดยส่วนใหญ่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง *Vpa*

ผลของความเค็มพิจารณาจากชุดการทดลองของ pH 6 (T1, T2 และ T3) pH 7 (T10, T11 และ T12) และ pH 9 (T28, T29 และ T30) ในสภาวะที่ pH คงที่ และแอมโมเนียมเท่ากับ 0 มก.ต่อลิตร พบว่าชุดทดลองที่ความเค็ม 15 และ 30 psu มีผลให้ค่าโซนใสในการยับยั้ง *Vpa* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับความเค็มที่ 0 psu และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าโซนใสที่ความเค็ม 15 และ 30 psu ระหว่าง T2 และ T3, T11 และ T12, T29 และ T30 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เนื่องจาก *P. decumbens* A5-1 เป็นราทนเค็มสามารถเจริญและรอดชีวิตได้เมื่อมีความเค็มเพิ่มขึ้น แต่ความเค็มที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลให้การเจริญของเส้นใยลดลง ว่าจะป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์อื่นด้วยการสร้างสปอร์ ดังรายงานค่าความเค็มที่เกิน 5% ว่าจะป้องกันเซลล์ให้อยู่รอดโดยการสร้างคลามายโดสปอร์เพิ่มขึ้นและสร้างเส้นใยหาอาหารลดลง (Mandeel, 2006) สอดคล้องกับรายงานของ Gunde-Cimerman *et al.* (2000) พบว่าในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือส่งผลให้ค่า $water\ activity\ (a_w)$ ในอาหารลดต่ำแต่พบกิจกรรมการย่อยเลือด (hemolytic activity) และการยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial activity) ของราสูงขึ้น (Sepcic *et al.*, 2011)

จากผลการศึกษาทั้ง pH ที่ค่อนข้างต่าง ความเค็มตั้งแต่ 0-30 psu และความเข้มข้นของแอมโมเนียมตั้งแต่ 0-1 มก.ต่อลิตร มีผลต่อปริมาณของสารยับยั้งที่สร้างขึ้น แอมโมเนียมในอาหารจะเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารทุติยภูมิให้กับราสอดคล้องกับค่าโซนใสที่ยับยั้ง *Vpa* กว้างขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมเพิ่มขึ้น การประยุกต์ใช้ *P. decumbens* มีข้อได้เปรียบเนื่องจากเราสามารถให้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น โปแตสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท ถั่วเหลืองและเคซีน (Mani *et al.*, 2016) แอมโมเนียมจะถูก

เปลี่ยนรูปด้วยเมตาบอลิซึมของราได้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิแบ่งตามโครงสร้างและสารตั้งต้นได้แก่ กลุ่ม steroids และ terpenoids, polyketides และกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย คือ peptides, indole-alkaloids, pyridines/pyridinones/piperazine/diketopiperazine และ pyrimidine/pyrimidinone (Xu *et al.*, 2015) จากรายงานพบว่า *P. decumbens* สร้างสารในกลุ่ม polyketides ชนิด decumbenones A และ B (Fujii *et al.*, 2002) และในกลุ่ม peptides ชนิด cyclopenicillone (Lin *et al.*, 2011)



ภาพที่ 5 *P. decumbens* A5-1 สร้างสารยับยั้ง *Vpa* ในชุดทดลอง pH 8 (ก)
อาหาร MHB ที่มีราและแบคทีเรียเจริญร่วมกันในชุด T21 และ T22 ที่เวลา 72 ชั่วโมง
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม TC2 (ข และ ค)

การประยุกต์ใช้ราในสภาวะจริงจะเป็นการเจริญร่วมกันของราและแบคทีเรียในน้ำ ผู้วิจัยได้ศึกษาความเข้มข้นของราในอาหารเหลว MHB ตามวิธีศึกษาข้อ 2.6 แสดงผลในตารางที่ 2 พบว่าที่ความเค็ม 10 psu ในชุดทดลอง T11 และ T12 หลังเติม *Vpa* ลงในน้ำเลี้ยงราที่ชั่วโมงที่ 0 พบว่า *Vpa* มีจำนวน 4.29×10^3 และ 4.51×10^3 CFU/mL ในชั่วโมงที่ 24, *Vpa* ลดจำนวนเหลือเพียง 80 และ 57 CFU/mL และมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 96 เมื่อเปรียบเทียบกับชุด TC1 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนั้นที่ความเค็ม 10 psu ความเข้มข้นของราในชุด T11 (รา 4 ชั้น มีสปอร์ 7.08×10^5 สปอร์/มล.) และ T12 (รา 5 ชั้น มีสปอร์ 1.36×10^6 สปอร์/มล.) สามารถยับยั้งและลดจำนวน *Vpa* ให้น้อยกว่า 100 CFU/mL ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

ที่ความเค็ม 20 psu ในชุดทดลอง T21 และ T22 หลังเติม *Vpa* ลงในน้ำเลี้ยงราที่ชั่วโมงที่ 0 พบว่า *Vpa* มีจำนวน 5.93×10^3 และ 4.56×10^3 CFU/mL ตามลำดับ ชั่วโมงที่ 24, *Vpa* ลดจำนวนเหลือ 100 และ 63 CFU/mL และ ไม่พบ *Vpa* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 สังเกตได้จากอาหาร MHB ในชุด T21 และ T22 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีลักษณะใสไม่มีตะกอน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 5 ข และ ค) ดังนั้นที่ความเค็ม 20 psu ความเข้มข้นของราในชุด T21 (รา 4 ชั้น มีสปอร์ 7.08×10^5 สปอร์/มล.) และ T22 (รา 5 ชั้น มีสปอร์ 1.36×10^6 สปอร์/มล.) สามารถลดจำนวน *Vpa* ให้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 CFU/mL ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างจากชุดทดลองที่ความเค็ม 30 psu พบว่าในชุดทดลอง T31 และ T32 หลังเติม *Vpa* ลงในน้ำเลี้ยงราที่ชั่วโมงที่ 0, *Vpa* มีจำนวน 1.65×10^4 และ 1.37×10^4 CFU/mL ชั่วโมงที่ 24 และ 48 จำนวน *Vpa* ทั้ง 2 ชุดการทดลองกลับมีจำนวนเพิ่มขึ้น และชั่วโมงที่ 72 และ 96 ยังพบจำนวน *Vpa* สูงถึง 4.22×10^3 และ 1.36×10^3 CFU/mL ตามลำดับ ดังนั้นที่ความเค็ม 30 psu รา *P. decumbens* A5-1 ไม่สามารถลดจำนวน *Vpa* ให้น้อยกว่า 100 CFU/mL ได้

ในชุดทดลองที่มีความเค็ม 10 และ 20 psu ความเข้มข้นของสปอร์ราที่ 7.08×10^5 สปอร์/มล. (4 ชั้น) และ 1.36×10^6 สปอร์/มล. (5 ชั้น) มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะยับยั้ง *Vpa* ได้มากกว่าที่ความเค็ม 30 psu เนื่องจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* จัดเป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 3-7% ของโซเดียมคลอไรด์ เซลล์จะเกิดความเครียดและปรับตัว เช่น *Vibrio brasiliensis* สร้างโปรตีน MotY (the sodium-type flagella protein MotY) เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีหน้าที่ขับเคลื่อน Na^+ ให้ได้เป็นพลังงานใช้ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ เมื่อมีความเค็มเพิ่มขึ้นแบคทีเรีย

จะเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นพบใน *Vp* และ *Vibrio cholerae* ด้วย (Atsumi *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ การเพิ่มสารพันธุกรรม โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอินทรีย์ออกนอกเซลล์ และการซ่อมแซมเซลล์ ดังนั้น *Vpa* จะซ่อมแซมเซลล์และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงขึ้นเพื่อการรอดชีวิต (Hu *et al.*, 2022) ในสภาวะที่มีเกลือสูง

ในชุดทดลองที่ 4 ผู้วิจัยจึงได้เพิ่มความเข้มข้นของราเป็น 6 ซีน มีสปอร์ 2.18×10^6 สปอร์/มล. (T41), 7 ซีน มีสปอร์ 2.47×10^6 สปอร์/มล. (T42) และ 8 ซีน มีสปอร์ 2.94×10^6 สปอร์/มล. (T43) และปรับใช้ 2% ของ *Vpa* ที่จำนวนเริ่มต้น 1.5×10^8 CFU/mL ผลแสดงในตารางที่ 3 พบว่าจำนวน *Vpa* ของ TC4 ที่ชั่วโมงที่ 0 และ 96 เท่ากับ 2.46×10^7 และ 1.97×10^{10} CFU/mL พบจำนวนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.57×10^{10} CFU/mL หลังเติม *Vpa* ลงในน้ำเลี้ยงราพบว่าในชุด T41 สามารถลดจำนวน *Vpa* ได้ต่ำสุดที่ 3.48×10^6 CFU/mL ในชั่วโมงที่ 0 เท่านั้น ส่วนในชุด T42 และ T43 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จำนวน *Vpa* ลดลงอย่างต่อเนื่องและชั่วโมงที่ 96 ลดจำนวนเหลือ 10 และ 27 CFU/mL ตามลำดับ ดังนั้นที่ความเค็ม 30 psu ความเข้มข้นของราในชุด T42 และ T43 ลดจำนวน *Vpa* ให้น้อยกว่า 100 CFU/mL ได้ที่ชั่วโมงที่ 96 (ภาพที่ 6) สอดคล้องกับรายงานของ Guo *et al.* (2023) รายงานว่าสารทุติยภูมิชนิด viridicatol, cyclophenol และ cyclophenol ที่ผลิตจากรา *Penicillium* sp. Z2230 ซึ่งคัดแยกจากพืชในทวีปอาร์กติกมีฤทธิ์ยับยั้ง *Vp*, *V. cholerae* และ *Vibrio vulnificus* สารจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptide deformylase (PDF) ไม่ให้ตัดหมู่ formyl group ออกจากปลายสายโปรตีนในขบวนการสังเคราะห์โปรตีนจึงเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Durand *et al.*, 1999)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ *P. decumbens* A5-1 และเวลาในการยับยั้ง *Vpa* ที่ความเค็มระดับต่าง ๆ

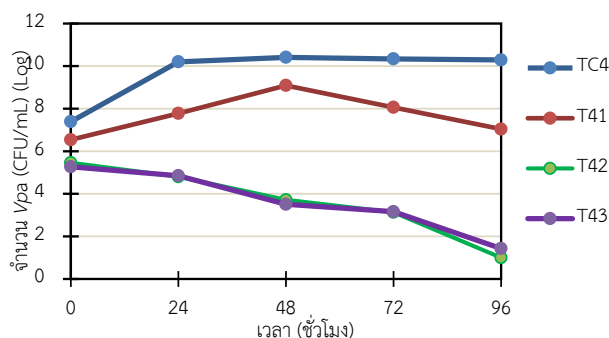
จำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CFU/mL) ที่เวลา 0-96 ชั่วโมง (<i>Vpa</i> เริ่มต้น 1.5×10^6 CFU/mL)									
เวลา	MHB 10 psu			MHB 20 psu			MHB 30 psu		
hr	TC1	T11	T12	TC2	T21	T22	TC3	T31	T32
	ควบคุม			ควบคุม			ควบคุม		
0	2.55×10^5	4.29×10^3	4.51×10^3	3.03×10^5	5.93×10^3	4.56×10^3	2.42×10^5	1.65×10^4	1.37×10^4
24	3.76×10^8	80*	57*	5.59×10^8	100*	63*	3.70×10^8	2.72×10^5	2.15×10^5
48	5.47×10^8	23*	3*	3.09×10^8	133*	0*	6.12×10^8	4.88×10^5	3.81×10^5
72	2.31×10^8	0*	0*	2.74×10^8	0*	0*	3.33×10^8	5.05×10^3	4.82×10^3
96	1.85×10^8	97*	10*	2.09×10^8	0*	0*	2.15×10^8	4.22×10^3	1.36×10^3

หมายเหตุ : * ความเข้มข้นที่ 10^0 ได้จำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 โคโลนี/มล.

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ *P. decumbens* A5-1 และเวลาในการยับยั้ง *Vpa* ที่ความเค็ม 30 psu

จำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CFU/mL) ที่เวลา 0-96 ชั่วโมง (<i>Vpa</i> เริ่มต้น 1.5×10^8 CFU/mL)				
เวลา	MHB 30 psu			
hr	TC4 ควบคุม	T41	T42	T43
0	2.46×10^7	3.48×10^6	2.86×10^5	1.85×10^5
24	1.59×10^8	6.09×10^7	6.34×10^4	7.06×10^4
48	2.57×10^{10}	1.22×10^9	5.3×10^3	3.26×10^3
72	2.21×10^{10}	1.14×10^8	1.36×10^3	1.45×10^3
96	1.97×10^{10}	1.1×10^7	10*	27*

หมายเหตุ : * ความเข้มข้นที่ 10^0 ได้จำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 โคโลนี/มล.



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของ *P. decumbens* A5-1 และเวลาในการยับยั้ง *Vpa* ที่ความเค็ม 30 psu

ผลของการเจริญร่วมกันในอาหารเหลวระหว่าง *P. decumbens* A5-1 และ *Vpa* สามารถประยุกต์ใช้ราในการเตรียมน้ำและบำบัดน้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ในกุ้งระยะ postlarval (15-20 psu) และกุ้งตัวเต็มวัย (5-10 psu) เนื่องจากราเจริญได้ในสภาพแวดล้อมเดียวกับกุ้ง เช่น pH ความเค็ม และใช้แอมโมเนียจากน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตของรา ความเข้มข้นของราที่ใช้ขึ้นกับความเค็มที่เพิ่มขึ้นและปริมาณ *Vp* โดยเฉลี่ยในน้ำ ความเค็มที่เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้ราสร้างสปอร์และสารยับยั้ง *Vp* ได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเข้มข้นของราและเวลาที่ให้ราเจริญเติบโตและสร้างสารยับยั้งในระบบเพาะเลี้ยงจริง ด้านความปลอดภัยในการก่อโรคของราในสัตว์น้ำเป็นเรื่องจำเป็นที่ต้องศึกษาในลำดับถัดไป ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้รา *P. decumbens* URM 6018 ร่วมกับ *Mucor subtilissimus* URM 4133, *Mucor* sp. URM 4146, *Mucor guilliermondii* URM 5848 และ *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 ที่คัดแยกได้จากอาหารรวม 5 สายพันธุ์ นำมาย่อยเคซินในนมแพะจนได้เปปไทด์ที่ขนาดโมเลกุล 3 ถึง 10 กิโลดาลตัน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ลดความดันโลหิต และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gomes *et al.*, 2022) การประยุกต์ใช้ราเพื่อเพิ่มมูลค่าในอาหารคนและอาหารสัตว์ที่ส่งเสริมการเจริญและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในอนาคต

4. สรุป

จากการคัดแยกราจากนาเกลือ อำเภอกำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร ช่วงเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกรกฎาคม 2561 พบว่าราสายพันธุ์ A5-1 เป็นสายพันธุ์ *Penicillium decumbens* A5-1 ที่สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเป็นราทนเค็มเจริญได้ที่ความเค็ม 0-60 psu *P. decumbens* A5-1 สามารถยับยั้ง *Vp* ที่คัดแยกจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรค EMS ได้ด้วยเทคนิค dual culture ราสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้ง *Vpa* ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งได้ที่ pH 6-9 ปริมาณแอมโมเนีย 0-1.0 มก.ต่อลิตร และความเค็ม 0-30 psu พบว่าทั้ง pH ปริมาณแอมโมเนียและความเค็มมีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของรา ในการศึกษาการเจริญร่วมกันในอาหารเหลวพบว่าราสามารถยับยั้ง *Vp* ที่มีจำนวนเริ่มต้นตั้งแต่ 10^5 - 10^7 CFU/mL ความเข้มข้นของราและเวลาที่ใช้ควบคุมจะแตกต่างกันขึ้นกับความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของ *Vp* เริ่มต้น ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้รา *P. decumbens* A5-1 เพื่อยับยั้ง *Vp* ที่เป็นสาเหตุของโรค EMS ที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลได้

5. เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Aziz, F.A. (2008). Diversity of aquatic fungi on *Phragmites australis* at lake Manzala, Egypt. *Sydowia*, 60(1): 1-14.
- Adiwidjaya, D., Raharjo, S.P., Sutikno, E., & Subiyanto, S. (2003). **Technical guidelines for environmentally friendly closed system vannamei shrimp farming**. Ministry of Marine Affairs and Fisheries, Directorate General of Aquaculture. (Jepara: Center for Brackish Water Cultivation Development) p. 29 [in Indonesia]

- Atsumi, T., McCartert, L., & Imae, Y. (1992). Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. **Nature**, **355**, 182-184.
- Barnett, H.L., & Hunter, B.B. (2006). **Illustrate genera of imperfect fungi**. New York: Macmillan Publishing Company.
- Butinar, L., Frisvad, J.C., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Hypersaline waters: A potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. **FEMS Microbiology Ecology**, **77**(1), 186-199.
- Chucherd, N. (2013). The case study of EMS in Thailand. **Asian Aquaculture Network, The Practical Megazine**, **4**(13), 14-19.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y.K., Subila, K.P., & Aravind, R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological Research**, **173**, 34-43.
- Durand, D.J., Gordon Green, B., O' Connell, J.F., & Grant, S.K. (1999). Peptide aldehyde inhibitors of bacterial peptide deformylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **367**(2), 297-302.
- Fuentes, M.E., & Quiñones, R.A. (2016). Carbon utilization profile of the filamentous fungal species *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium decumbens*, and *Sarocladium strictum* isolated from marine coastal environments. **Mycologia**, **108**(6), 1069-1081.
- Fujii, Y., Asahara, M., Ichinoe, M., & Nakajima, H. (2002). Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens*. **Phytochemistry**, **60**(7): 703-708.
- Gomes, J.E.G., Nascimento, T.C.E.S, de Souza-Motta, C.M., Montalvo, G.S.A., Boscolo, M., Gomes, E., Moreira, K.A., Pintado, M.M., & Silva, R.D. (2022). Screening and application of fungal proteases for goat casein hydrolysis towards the development of bioactive hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, **16**(6), 4650-4664.
- Griffith, R. W. (1994). The life of the first vertebrates. **Bioscience**, **44**(6): 408-417.
- Guevara-Suarez, M., Sutton, D., Cano-Lira, J., García, D., Martin-Vicente, A., Wiederhold, N., Guarro, J., & Gené, J. (2016). Identification and antifungal susceptibility of *Penicillium*-like fungi from clinical samples in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, **54**(8), 2155-2161.
- Gunasekaran, P. (1995). **Laboratory manual in Microbiology**. New Delhi: New Age International Publishers.
- Gunde-Cimerman, N., Zalarb, P., de Hoog, S., & Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, **32**(3), 235-240.
- Guo, J., Yang, J., Wang, P., Guo, B., Li, H., Zhang, D., An, F., & Gao, S. (2023). Anti-vibriosis bioactive molecules from Arctic *Penicillium* sp. Z2230. **Bioresources and Bioprocessing**, **10**(1), 11.
- Haliman, R.W., & Adijaya, D. S. (2005). **Vanamei shrimp and disease-resistant white shrimp market prospects**. (Jakarta: Penebar Swadaya) p.75 [in Indonesian]
- Hu, S., Li, Y., Wang, B., Yin, L., & Jia, X. (2022). Effects of NaCl concentration on the behavior of *Vibrio brasiliensis* and transcriptome analysis. **Foods**, **11**(1), 840-856.

- Kushner, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In Vreeland, R. H. & Hochstein, L. (Eds.), **The Biology of halophilic bacteria** (87-103). Florida: CRC Press.
- Lin, S., Shi, T., Chen, K.Y., Zhang, Z.X., Shan, L., Shen, Y.H., & Zhang, W.D. (2011). Cyclopicenillone, a unique cyclopentenone from the cultures of *Penicillium decumbens*. **Chemical Communications**, **37**, 10413-10415.
- Mandeel, Q.A. (2006). Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. **Journal of Basic Microbiology**, **46**(6), 480-494.
- Mani, A., Chauhan, R., & Abraham, J. (2016). Antimicrobial and antioxidant potential of *Penicillium decumbens* strain AJA1 against various pathogens. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, **9**(7), 801.
- Ong, C.J.N., Clemente, R.F., Alajjos, O.R., Pascual, L.J., Aguilar, R.N., & Desacula, R. (2023). In-silico molecular phylogeny of Philippine Myxomycetes using 18S rRNA and small subunit rRNA (SSU) gene Sequences. **Journal of Tropical Life Science**, **13**(3), 421-430.
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., & Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from garcinia plants. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, **51**(3): 517-525.
- Plemenita, A., Vaupotic, T., Lenassi, M., Kogej, T., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: A molecular perspective at a glance, **Studies in Mycology**, **61**, 67-75.
- Sepcic, K., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. **Mar Drugs**, **9**(1), 43-58.
- Suantika, G., Lumbantoruan, G., Muhammad, H., Azizah, F.F.N., & Aditiawati, P. (2015). Performance of zero water discharge (ZWD) system with nitrifying bacteria and microalgae *Chaetoceros calcitrans* components in super intensive white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture. **Journal Aquaculture Research & Development**, **6**(9), 359-364.
- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. **Mar Drugs**, **13**(6), 3479-3513.
- Yeung, P.S., & Boor, K.J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, **1**(2), 74-88.
- Yingkajorn, M., Mitraparp-Arthorn, P., Nuanualsuwan, S., Poomwised, R., Kongchuay, N., Khamhaeng, N., & Vuddhakul, V. (2014). Prevalence and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during shrimp culture in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, **112**(2), 103-111.
- Zhou, Q., Li, K., Xie, J., & Liu, B. (2009). Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**, **100**(16), 3780-3786.

(Received: 1/Apr/2024, Revised: 13/Jun/2024, Accepted: 24/Jun/2024)